

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 254—258, Mai 1970

Eine vereinfachte Methode zur Bestimmung der Aktivität von Renin im menschlichen Plasma

Von H. KAULHAUSEN¹⁾, B. FILLMANN und H. BREUER

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Klinische Chemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 30. Januar 1970)

Zur Bestimmung der Aktivität von Renin im menschlichen Plasma wird ein vereinfachtes Verfahren beschrieben. Dabei dient als Substrat das Plasma beidseitig nephrektomierter männlicher Katzen. Die Angiotensinasen in der zu untersuchenden Plasmaprobe und im Reninsubstrat werden durch Dialysen gegen EDTA-haltige Puffer bei niedrigen pH-Werten (3,3 bzw. 3,9) inaktiviert. Die Inkubation wird mit 0,5 ml/menschlichen Plasmas bei pH 7,5 durchgeführt. Das bei der Inkubation gebildete Angiotensin II wird im Rattenblutdruckversuch in Form eines „Bracket Assay“ bestimmt. Die Methode ist empfindlich, liefert gut reproduzierbare Werte und ist daher für klinische Untersuchungen geeignet. Mit Hilfe des angegebenen Verfahrens wurde die Reninaktivität im peripheren venösen Plasma von 10 normotonen, gesunden Personen in Ruhe sowie nach Belastung bestimmt; die erhaltenen Werte werden mit den Literaturwerten verglichen. Außerdem wurde der Aktivitätsverlauf von Renin im Plasma einer Patientin nach doppelseitiger Nephrektomie verfolgt.

A simplified method for the determination in the renin activity in human plasma

A simplified method for the determination of renin activity in human plasma is described; plasma of bilaterally nephrectomised male cats is used as substrate. The angiotensinases, present in the plasma to be investigated and in the substrate, are inactivated by dialysis against EDTA-containing buffers at low pH values (3.3 and 3.9, respectively). The incubation is carried out at pH 7.5 with 0.5 ml of human plasma. The angiotensin II, formed during incubation, is measured by the response of blood pressure in the carotid artery in rats, using the bracket assay. The method has a relatively high sensitivity and shows good reproducibility; it is suitable for clinical routine investigations. The activity of renin was measured in the peripheral venous plasma of 20 normotensive healthy subjects; the values obtained are compared with those reported in the literature. In addition, the activity of plasma renin was followed in a female patient after bilateral nephrectomy.

Die Bestimmung von Renin hat während der letzten Jahre insbesondere bei der Differentialdiagnostik des primären und sekundären Aldosteronismus an Bedeutung gewonnen. Aus methodischen Gründen sind die bisher in der Literatur angegebenen Verfahren für eine breitere Anwendung in der Klinik nicht geeignet. Die Hauptschwierigkeiten bei der Plasmarenin-Bestimmung sind einmal durch den unkontrollierbaren Ablauf der Reninsubstrat-Renin-Reaktion vor der Inkubation bedingt, zum anderen durch den enzymatischen Abbau des gebildeten Angiotensins während und nach der Inkubation. Bei einem Teil der bekannten Methoden wird das im menschlichen Plasma vorhandene Reninsubstrat zerstört und heterologes Substrat unmittelbar vor der Inkubation zugesetzt (1—5). In anderen Verfahren bleibt das in der Plasmaprobe vorhandene autologe Reninsubstrat durch Abkühlen des Blutes auf 0—5° erhalten (4, 6—13). Vor- und Nachteile der erwähnten Methoden sind in der Literatur ausführlich beschrieben worden (2, 3, 10, 14, 15).

Im Folgenden wird über eine vereinfachte Methode zur Bestimmung der Reninaktivität im menschlichen Plasma berichtet. Bei dieser Methode werden die Angiotensinasen inaktiviert und somit die quantitative Wiederingang des während der Inkubation mit heterologem Reninsubstrat gebildeten Angiotensins ermöglicht. Neben der relativ einfachen Durchführung und der guten Präzision besitzt das hier angegebene Verfahren den

Vorteil, daß nur geringe Blutmengen (1 ml pro Bestimmung) erforderlich sind. Die Methode wird seit einem Jahr im Laboratorium der Autoren angewendet und hat sich bewährt.

Methodik

Reagenzien und Lösungen

Alle Reagenzien waren von p. a.-Reinheitsgrad (E. Merck AG, Darmstadt). Zum Silikonisieren der Glasgeräte wird eine 1proz. Lösung von Silikonöl in Benzol verwendet.

Pufferlösung A (pH 3,9) enthält im l 6,62 g Citronensäure · H₂O, 13,25 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 4,80 g NaCl und 1,90 g Na₂-EDTA · 2 H₂O.

Pufferlösung B (pH 7,5) enthält im l 1,68 g NaH₂PO₄ · H₂O, 31,05 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 4,38 g NaCl und 0,37 g Na₂-EDTA · 2 H₂O.

Pufferlösung C (pH 3,3) enthält im l 3,75 g Glycin, 36,50 ml 0,2 N HCl, 5,55 g NaCl und 1,90 g Na₂-EDTA · 2 H₂O.

Pharmaka

Bykomycin: Durchstechflasche mit 500 mg Neomycinsulfat (Byk-Gulden Lomberg, Chemische Fabrik GmbH, Konstanz).

Ecolid: Ampullen mit 5 mg/ml (CIBA AG, Basel, Schweiz).

Hypertensin CIBA: Trockenampullen mit 0,5 mg (CIBA AG, Basel, Schweiz). Der Inhalt einer Ampulle wird in 50 ml einer physiol. NaCl-Lösung gelöst und in kleinen Proben (1 ml) in silikonisierten Glasröhrchen bei —15° eingefroren aufbewahrt. Vor jeder Messung werden 0,5 ml der Lösung mit physiol. NaCl-Lösung auf 50 ml verdünnt; die so hergestellte Lösung wird als Vergleichslösung benutzt. 0,1 ml dieser Lösung entsprechen im Rattenblutdruckversuch einer Menge von 10 ng gebildetem Angiotensin.

Liquemin: Ampullenflasche zu 5 ml mit 25 000 USP-Einheiten Heparin (Deutsche Hoffmann-La Roche AG, Grenzach/Baden).

Numal-Roche (Aprobarbital): Injektionslösung 10proz. (F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel, Schweiz).

¹⁾ Teil der Dissertation H. KAULHAUSEN, Medizinische Fakultät der Universität Bonn, 1970.

Renin-NBCo: 1200fach gereinigtes Renin aus Schweinenieren, lypophilisiert (Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland 28, Ohio, USA).

Geräte

Statham-Membran P 23 AA: 0 bis 75 cm Hg, 12 Vmax (Statham Instruments Inc., Hato Ray, Puerto Rico).
Atlas-Druckmeßgerät EM 50 (Atlas-Werke AG, Bremen).
Linecomp-Schreiber (Hartmann & Braun, Frankfurt/Main).
Dialyserschlauch: Ø 18 mm (Kalle AG, Wiesbaden-Biebrich).

Präparation von Reninsubstrat aus Katzenplasma

Zwei männliche Katzen werden mit Aprobital anästhesiert (0,5 ml pro kg Körpergewicht intraperitoneal) und anschließend bilateral nephrektomiert. 24 Stdn. später werden die Halsschlagadern der erneut anästhesierten Tiere freipräpariert und durchtrennt. Das Blut wird in einem 400-ml-Becherglas, das unmittelbar vorher mit einer 3,8proz. (Gew./Vol.) Natriumcitratlösung benetzt wurde, aufgefangen; nach weiterer Zugabe der 3,8proz. Natriumcitratlösung bis zu einer Endkonzentration von 10% (Vol./Vol.) wird 10 Min. bei 1500 g zentrifugiert. Das auf diese Weise gewonnene Plasma (etwa 50 ml pro Tier) wird 48 Stdn. gegen 1 l Puffer A (pH 3,9) dialysiert²⁾. Diese Dialyse erfolgt im Kühlraum bei +5° unter mechanischem Rühren der Pufferlösung, die nach 24 Stdn. erneuert wird. Der im Plasma entstandene Niederschlag wird abzentrifugiert. Der Überstand wird 48 Stdn. gegen 1 l Puffer B (pH 7,5) dialysiert, dem 500 mg Neomycinsulfat (entsprechend dem Inhalt einer Durchstechflasche Bykomylin) als Bakteriostatikum zugesetzt wird; auch diese Pufferlösung wird nach 24 Stdn. erneuert. Durch die Dialyse stellt sich der pH-Wert des Plasmas auf 7,5 ein. Die dialysierten Plasmaproben werden vereinigt, erneut bei 1500 g zentrifugiert und in kleinen Portionen (etwa 2 ml) eingefroren.

Gewinnung und Vorbehandlung von menschlichem Plasma zur Bestimmung der Reninaktivität

Durch Punktieren einer Armvene werden 2–5 ml Blut langsam in eine mit Liquemin³⁾ benetzte Einmalspritze aufgezogen, in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt und 10 Min. bei 1500 g zentrifugiert. Das Plasma wird mit einer Meßpipette in einen Dialyserschlauch eingefüllt; dabei wird das Volumen gemessen. Zunächst wird 24 Stdn. bei +5° gegen 1 l Puffer C (pH 3,3) dialysiert; bei dieser Dialyse wird das endogene Reninsubstrat zerstört. Anschließend wird der Schlauch mit Wasser abgespült und das Plasma weitere 24 Stdn. gegen 1 l Puffer B (pH 7,5) dialysiert, der 500 mg Neomycin enthält. Bei Verwendung von 1 l Puffer B können 5 Plasmaproben gleichzeitig dialysiert werden. Nach der Dialyse wird das Plasma in ein Zentrifugenglas oder in einen Plastikbehälter überführt und sein Volumen kontrolliert. Ein Volumenverlust, der häufig trotz genauen Arbeitens auftreten kann, ist auf die höhere Molarität des Puffers B zurückzuführen; der Verlust beträgt maximal 10% des ursprünglichen Volumens und kann durch Hinzufügen von physiol. NaCl-Lösung ausgeglichen werden. Zur Bestimmung der Reninaktivität wird die Plasmaprobe entweder sofort mit heterologem Substrat (Katzenplasma) inkubiert oder — falls die Inkubation später erfolgen soll — eingefroren. Die eingefrorenen Plasmaproben sind ohne Aktivitätsverlust mehrere Wochen haltbar.

Definitionen

Renin-Einheit: Eine Renin-Einheit ist die Reninaktivität in 0,5 ml Plasma, die unter Zusatz von 0,2 ml Reninsubstrat (Katzen-

²⁾ Bei einem pH-Wert von 3,9 wird das endogene Reninsubstrat noch nicht zerstört.

³⁾ Es sei hier ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die Liquemin-Menge eine kritische Größe darstellt. Zur Erzielung reproduzierbarer Werte sind nach unseren Erfahrungen 50 Einheiten Heparin/ml Blut erforderlich. Vgl. dazu die Arbeit von SEALBY und Mitarbeitern (25), in der über die Hemmung der Reninaktivität durch eine Heparin-Präparation berichtet wird und auf die in einer späteren Untersuchung eingegangen werden soll.

plasma) in einer 20stdg. Inkubation bei 37° 1 ng Angiotensin II freigesetzt.

Reninsubstrat-Einheit: Ein ng Angiotensin-II-Äquivalent ist die Menge Substrat, die bei Inkubation mit einem Überschuß an Renin (Renin NBCo) 1 ng Angiotensin II liefert.

Ergebnisse

Durchführung des vereinfachten Verfahrens zur Bestimmung der Reninaktivität

0,5 ml der zu untersuchenden Plasmaprobe werden mit 0,2 ml Reninsubstrat (Katzenplasma) 20 Stdn. bei 37° inkubiert. Um eine Adsorption von Angiotensin an Glas zu vermeiden (15), werden die Inkubationen in silikonisierten Zentrifugenröhrchen durchgeführt. Da die Reninaktivität stark temperaturabhängig ist (3, 6, 16), muß auf Temperaturkonstanz geachtet werden. Die Bildung von Pepsitensin (17) wird durch Inkubation bei einem pH-Wert von 7,5 verhindert. Die Inkubationen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt; sie erfolgen unter mäßigem Schütteln im Wasserbad und werden durch Fällung des Eiweißes mit 7 ml 96proz. Äthanol beendet. Der entstandene Niederschlag wird bei 1500 g abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein silikonisiertes Reagenzglas mit Schliff überführt und der Rückstand mit 7 ml 96proz. Äthanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wird der Überstand mit dem ersten vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum bei 30° zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 1 ml physiol. NaCl-Lösung aufgenommen. Diese Lösung, die das während der Inkubation gebildete Angiotensin II enthält, wird quantitativ in ein kleines silikonisiertes Reagenzglas überführt und bis zur Messung, die am gleichen oder spätestens am nächsten Tag erfolgen muß, im Kühlschrank bei +5° aufbewahrt. Zur Messung des gebildeten Angiotensin II wird eine 100 bis 150 g schwere weibliche Wistar-Ratte anästhesiert (0,1 ml Aprobital/100 g Körpergewicht intraperitoneal). Eine Vena jugularis interna sowie eine Arteria carotis communis werden freipräpariert und in beide Gefäße feine Kanülen eingeführt. Dann werden in die Vene 0,2 ml einer 10proz. Ecolidlösung zum Senken und Stabilisieren des Blutdruckes sowie 0,1 ml Liquemin zum Heparinisieren des Blutes injiziert, später auch die Meßlösungen und die Vergleichslösungen (Hypertensin CIBA). Der Blutdruck des Versuchstieres wird aus der Arteria carotis über eine Statham-Membran auf ein Druckmeßgerät übertragen und auf einem Linecomp-Schreiber registriert. Die zu untersuchenden Lösungen werden in Proben von 0,1 ml oder weniger injiziert; zwischen zwei Injektionen wird die zuführende Kanüle mit 0,1 ml einer physiol. NaCl-Lösung nachgespült und die Angiotensin-II-Konzentration im „Bracket Assay“ (Abb. 1) durch Vergleich mit einer Hypertensin-CIBA-Standardlösung ermittelt. Dieser Wert wird in Renin-Einheiten (R.E.) angegeben.

Hemmung der Angiotensinasen

Im Plasma kommen Peptidasen vor, die Angiotensin II spalten. Eine dieser Angiotensinasen hat ein pH-Optimum bei 4,5, eine andere, die Calciumionen zur Aktivierung

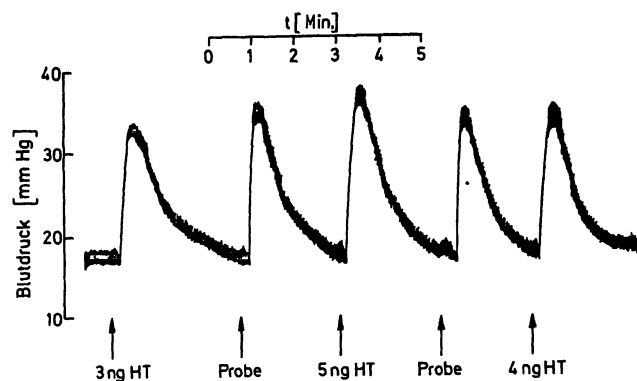


Abb. 1

Bestimmung der Reninaktivität im menschlichen Plasma mit Hilfe des „Bracket Assay“. Hierbei wird die Wirkung von Angiotensin II, das bei der Inkubation von Reninsubstrat (Katzenplasma) mit menschlichem Plasmaprotein entsteht, mit derjenigen einer Standardlösung von Hypertensin CIBA auf den Blutdruck der Ratte verglichen.

Jeweils 0,1 ml der zu untersuchenden Lösung wird so lange abwechselnd mit verschiedenen Mengen der Standardlösung (zwischen 3 und 5 ng Hypertensin CIBA [HT]) intravenös injiziert, bis die Wirkungen auf den Blutdruck annähernd übereinstimmen. Der Blutdruck wird blutig mit einem Druckmeßgerät gemessen und auf einen Linecomp-Schreiber übertragen.

benötigt, ein pH-Optimum bei 7,5 (18). Außerdem kann Angiotensin durch bakterielle Peptidasen zerstört werden (10).

Bei dem hier beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der Reninaktivität werden die Angiotensinasen entsprechend der Methode von SKINNER (4) während der Dialysen des Reninsubstrates (Katzenplasma) und der zu untersuchenden Plasmaprobe zerstört. Dies geschieht einmal durch vorübergehende Erniedrigung des pH-Wertes, wie bereits 1946 von BRAUN-MENÉNDEZ und Mitarbeitern (19) beschrieben, zum anderen durch Einwirkung von EDTA, dessen Bedeutung für die Hemmung der Angiotensinasen KHAIRALLAH und Mitarbeiter (18) erkannten. EDTA bindet die Calciumionen und inaktiviert dadurch diejenige Angiotensinase, deren pH-Optimum bei 7,5 liegt. Bei Anwendung einer Konzentration von maximal 2 g/l bleibt EDTA ohne Einfluß auf die Reninsubstrat-Renin-Reaktion (11). Um die Einwirkung bakterieller Angiotensinasen zu verhindern, werden die Pufferlösungen sterilisiert; außerdem wird dem Puffer B vor der Dialyse Neomycinsulfat zugesetzt, das in der Konzentration von 500 mg/l die enzymatische Reaktion nicht beeinflusst (20). Durch diese Maßnahme wird im Reninsubstrat eine vollständige Inaktivierung und in der zu untersuchenden

Plasmaprobe eine 90proz. Hemmung der Angiotensinasen erreicht (vgl. Tab. 1). Die Entstehung anderer pressorischer Substanzen als Angiotensin II konnte weitgehend ausgeschaltet werden.

Eigenschaften des Reninsubstrates

Das Substrat soll folgende Eigenschaften besitzen:

1. Es soll bei der Inkubation mit menschlichem Renin meßbare und von der Enzymkonzentration abhängige Mengen Angiotensin II bilden,
2. Es soll selbst weder Renin noch Angiotensinasen-Aktivitäten enthalten.
3. Es soll ohne Zusatz von Renin keine pressorischen Substanzen bilden.

Um Punkt 1 zu prüfen, wurde eine Enzym-Substrat-Kurve aufgestellt. Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, nimmt bei Verwendung von Katzenplasma als Reninsubstrat die Bildung von Angiotensin II mit steigender Enzymmenge (Renin der NBCo) zu. Unter den gewählten Versuchsbedingungen setzte 1 G.U.⁴⁾ Renin aus 1 ml Katzenplasma 800 ng Angiotensin-II-Äquivalente frei. Dieser Wert entspricht etwa demjenigen, der im Plasma des Menschen ermittelt wurde. So fanden GOULD und Mitarbeiter (2) sowie PICKENS und Mitarbeiter (11) bei insgesamt 50 Normalpersonen einen Mittelwert

⁴⁾ G.U. = Goldblatt-Einheit (1 Einheit entspricht der Bildung von 1 ng Angiotensin pro Min.).

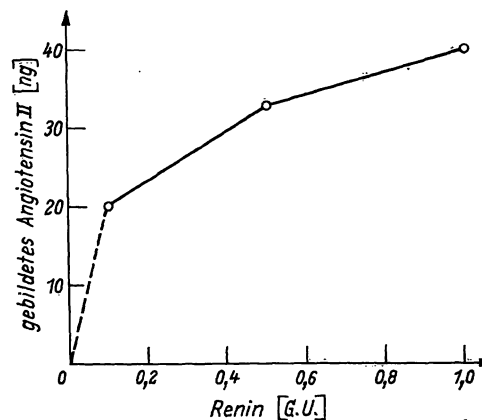


Abb. 2

Bildung von Angiotensin in vorbehandeltem Katzenplasma in Abhängigkeit von der Reninmenge. 0,05 ml Reninsubstrat (dialysiertes und mit EDTA vorbehandeltes Plasma nephrektomierter männlicher Katzen) wurden bei pH 7,5 mit steigenden Mengen (0,1–1,0 G.U.) Renin (NBCo) 20 Stdn. bei 37° inkubiert. Die Bestimmung des gebildeten Angiotensins erfolgte an der Ratte mit Hilfe des „Bracket Assay“.

Tab. 1

Wiederfindung von Angiotensin (Hypertensin CIBA) nach Inkubation mit Reninsubstrat (Katzenplasma) sowie mit Plasmaproben des Menschen. Alle Inkubationen wurden bei pH 7,5 durchgeführt. Versuchsdauer 20 Stdn. (Versuche 1–3) bzw. 5 Stdn. (Versuche 4–7). Die Angiotensinasen waren durch Dialyse der Plasmen gegen EDTA-haltige Puffer bei niedrigen pH-Werten inaktiviert worden.

Versuch	Angiotensin II inkubiert [ng]	Reninsubstrat (Katzenplasma) [ml]	Plasmaprobe [ml]	Plasma vor- behandelt bei pH	Angiotensin II nachgewiesen [ng]	Angiotensin II wiedergefunden [%]
1	200	0	—	—	200	100
2	200	0,2	—	3,3	200	100
3	200	0,2	—	3,3	200	100
4	0	—	1,0	3,6	10	—
5	200	—	1,0	3,6	210	100
6	0	—	1,0	3,8	20	—
7	200	—	1,0	3,8	200	90
8	0	—	1,0	4,0	20	—
9	200	—	1,0	4,0	220	100
10	0	—	1,0	4,2	20	—
11	200	—	1,0	4,2	240	110

von 700 (Bereich 450 bis 1000) ng Angiotensin-II-Äquivalenten/ml Plasma. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß menschliches Renin zum Reninsubstrat im Katzenplasma die gleiche Affinität hat wie zu dem im menschlichen Plasma (6).

Das unter Punkt 2 geforderte Renin-freie Plasma wurde von Katzen gewonnen, die 24 Std. vor der Blutentnahme beidseitig nephrektomiert worden waren; durch die Nephrektomie wird gleichzeitig ein Anstieg der Konzentration von Reninsubstrat erreicht (21, 22). Da mit der Möglichkeit gerechnet werden muß, daß Renin auch im Uterus gebildet wird, dienten zur Gewinnung des Reninsubstrates ausschließlich nephrektomierte männliche Katzen. Die Aktivität der im Katzenplasma vorhandenen Angiotensinasen wird, wie oben bereits erwähnt, durch Dialyse bei niedrigen pH-Werten sowie durch die Anwesenheit von EDTA in den Pufferlösungen gehemmt.

Trotz der geschilderten Vorsichtsmaßnahmen konnte, wie Leerinkubationen zeigten, das Auftreten pressorischer Aktivitäten nicht ganz vermieden werden. Die Analysenergebnisse wurden jedoch durch diese Aktivitäten praktisch nicht beeinflusst.

Präzision der Methode

Die Präzision wurde durch eine 9fach-Bestimmung der Reninaktivität im Plasma einer männlichen Normalperson ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3 dargestellt. Bei einem Mittelwert von 45,0 R.E. betrug die Standardabweichung (s) $\pm 6,0$ und der Variationskoeffizient (VK) 13%.

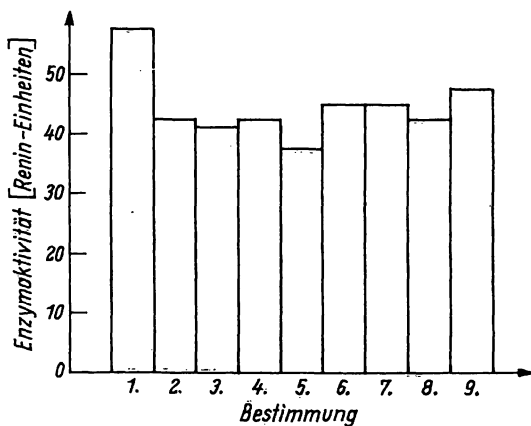


Abb. 3

Graphische Darstellung einer 9fach-Bestimmung der Reninaktivität im Plasma einer Normalperson. Jeweils 0,5 ml Plasma wurden mit 0,2 ml Reninsubstrat (Katzenplasma) 20 Std. bei 37° inkubiert. Die Messung des gebildeten Angiotensins erfolgte an der Ratte mit Hilfe des „Bracket Assay“

Normalwerte

Die Reninaktivität im peripheren venösen Plasma wurde bei 10 normotonen, gesunden Personen im Alter zwischen 22 und 36 Jahren bestimmt. Die Blutentnahmen erfolgten nach mindestens 6stündiger Nachtruhe zwischen 7 und 8 Uhr beim liegenden Patienten sowie am gleichen Tag nach 4stündiger Tätigkeit (Arbeit im Laboratorium). Um einen Einfluß von Steroidhormonen auf die Reninaktivität auszuschließen,

Tab. 2

Reninaktivität im Plasma weiblicher und männlicher Normalpersonen nach 6stündiger Nachtruhe (Ruhewert) und nach anschließender 4stündiger Arbeit im Laboratorium (Belastungswert). Weitere Einzelheiten vgl. Methodik

Versuchsperson	Geschlecht	Alter Jahre	Ruhewert R. E.	Belastungswert R. E.
U.H.	♀	28	25,0	40,0
G.K.	♀	25	20,0	37,5
M.S.	♀	29	25,0	40,0
K.T.	♀	23	20,0	20,0
P.B.	♀	26	27,5	20,0
E.D.	♀	36	32,5	40,0
H.H.	♀	26	25,0	40,0
H.K.	♀	23	15,0	20,0
H.O.	♀	22	20,0	25,0
L.S.	♂	25	27,5	30,0

Tab. 3

Normalwerte der Reninaktivität im menschlichen Plasma. Die aus der Literatur entnommenen Werte wurden auf ng freigesetztes Angiotensin/10 ml Plasma/Std. umgerechnet

V Verfahren	Reninaktivität (R. E.) Bereich	\bar{x}	n
Eigenes*)			
Ruhewerte	15,0—32,5	25,0	10
Werte unter Belastung	20,0—40,0	32,5	10
BROWN und Mitarb. (1)*)	2,0—18,0	8,2	125
SKINNER (4)*)		91,0	45
BOUCHER und Mitarb. (8)	0—190,0	50,0	20
PICKENS (11)	1,5—12,5	6,5	31
BOUCHER nach KLAUS und HEIZMANN (15)	1,7—5,0	3,3	6
PICKENS nach KLAUS und HEIZMANN (15)	1,0—2,7	1,9	5

*) Bei diesem Verfahren wird vor der Inkubation heterologes Substrat zugesetzt.

erfolgten die Untersuchungen nur an solchen weiblichen Versuchspersonen, die keine Ovulationshemmer nahmen und bei denen keine Schwangerschaft bestand. Wie aus den Werten der Tabelle 2 hervorgeht, ergaben sich zwischen männlichen und weiblichen Versuchspersonen keine Unterschiede.

Die Ruhewerte lagen zwischen 15,0 und 32,5 R.E.; bei einem Mittelwert von 25,0 R.E. betrug die Standardabweichung $\pm 5,0$. Die Werte unter Belastung schwankten zwischen 20,0 und 40,0 R.E.; bei einem Mittelwert von 32,5 R.E. betrug die Standardabweichung $\pm 9,0$.

Obwohl die Reninaktivität im Plasma nach Belastung — mit Ausnahme von 2 Personen — meßbar angestiegen war, ergab der t-Test nach STUDENT keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Ruhe- und Belastungswerten ($0,05 > p > 0,025$). Die mit der vorliegenden Methode ermittelten Reninaktivitäten wurden mit denjenigen anderer Autoren verglichen (Tab. 3).

Die unterschiedlichen Werte sind durch die verschiedene Aufarbeitung der Plasma- und Substratproben, durch die verschiedenen langen Inkubationszeiten und die verschieden großen Mengen der inkubierten Plasmen bedingt.

Reninaktivität nach bilateraler Nephrektomie

Im Hinblick auf die Möglichkeit einer extrarenalen Bildung von Renin wurde die Reninaktivität im Plasma einer 18jährigen Patientin vor Durchführung einer doppelseitigen Nephrektomie ermittelt und der Aktivitätsverlauf nach der Operation verfolgt. Zwei Tage vor der Operation lag die Reninaktivität mit 20,0 R.E. im Normalbereich. Weitere Bestimmungen, die 7, 23 und

47 Std. nach der Operation durchgeführt wurden, zeigten nach anfänglichem starken Abfall einen linearen Wiederanstieg der Reninaktivität; die nach zwei Tagen beobachteten postoperativen Werte lagen höher als die präoperativen Werte. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen von CAPELLI und Mitarbeitern (23), jedoch im Widerspruch zu den Resultaten von VERNIORY und Mitarbeitern (24). Deshalb sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die Frage zu klären, ob Renin auch extrarenal — z. B. im Uterus — gebildet wird.

Diskussion

Seit 1963 sind zahlreiche Methoden zur Bestimmung von Renin in der Literatur beschrieben worden; diese sind jedoch für klinische Untersuchungen meist zu kompliziert oder zu aufwendig. Das hier beschriebene Verfahren ist wesentlich einfacher als die am häufigsten angewandten Methoden von BROWN und Mitarbeitern (1) und von BOUCHER und Mitarbeitern (8). Filtrationen, Chromatographien und Elutionen, also Arbeitsgänge, bei denen Reninverluste auftreten können, werden im Gegensatz zu dem Verfahren nach BROWN (1), bei dem nur 37% des ursprünglich vorhandenen Renins wiedergefunden werden, vermieden. Die Angiotensinasen im menschlichen Plasma sowie im Reninsubstrat werden 1. durch eine Dialyse bei niedrigem pH-Wert und 2. durch Zusatz von EDTA zu den Pufferlösungen vollständig inaktiviert; dadurch wird eine 20stdg. Inkubation ermöglicht. Infolge der relativ langen Inkubationszeit sind mit diesem Verfahren noch

Reninaktivitäten von 5 Renin-Einheiten meßbar. Im Gegensatz zu unserem Vorgehen hemmen andere Autoren die Angiotensinasen nicht und werden deshalb zu kurzen Inkubationszeiten gezwungen (6); geringe Plasmaaktivitäten können dann nicht mehr erfaßt werden.

Die durchschnittliche Wiederfindung von Angiotensin, das der Inkubationslösung bis zu einer Endkonzentration von 200 ng/ml zugefügt wurde, beträgt etwa 95%. Dagegen beträgt die Wiederfindung bei BOUCHER und Mitarbeitern (8, 15) durchschnittlich 80%, während bei dem Verfahren nach DE VITO und FASCILOLO (10) nahezu die Hälfte des gebildeten Angiotensins während der aufwendigen Reinigung verlorenggeht. Die Fehlerbreite bei Doppelbestimmungen liegt nach der Methode von PICKENS und Mitarbeitern (11) bei $\pm 40\%$ (15) und ist auch bei dem Verfahren nach BOUCHER und Mitarbeitern (8) mit $\pm 20\%$ (15) noch beträchtlich. Der Fehlerbereich der eigenen Methode beträgt $\pm 10\%$ und ist damit relativ klein; durch Mehrfachbestimmungen kann die Präzision noch erhöht werden. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß nur geringe Blut- bzw. Plasamengen zur Analyse notwendig sind. So sind für eine Einzelbestimmung 0,5 ml Plasma ausreichend, während nach BROWN und Mitarbeitern (1) etwa 25 ml und nach BOUCHER und Mitarbeitern (8) 30 bis 50 ml Plasma für eine Reninbestimmung benötigt werden. Die verhältnismäßig lange Dialysendauer stellt keinen wesentlichen Nachteil dar, da die Reninbestimmung bei der Differentialdiagnose akuter Erkrankungen bisher keine Rolle spielt.

Literatur

1. BROWN, J. J., D. L. DAVIES, A. F. LEVER, J. I. S. ROBERTSON und M. TREE, *Biochem. J.* 93, 594 (1964). — 2. GOULD, A. B., L. T. SKEGGS und J. R. KAHN, *Lab. Invest.* 15, 1802 (1966). — 3. LEE, M. R., W. F. COOK und J. K. MCKENZIE, *Circulat. Res.* 19, 260 (1966). — 4. SKINNER, S. L., *Circulat. Res.* 20, 391 (1967). — 5. POULSEN, K., *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 21, 49 (1968). — 6. HELMER, O. M. und W. E. JUDSON, *Circulation* 27, 1050 (1963). — 7. GUNNELS, J. C., C. E. GRIM, R. R. ROBINSON und N. M. WILDERMANN, *Arch. Int. Med. Chicago* 119, 232 (1967). — 8. BOUCHER, R., R. VEYRAT, J. DE CHAMPLAIN und J. GENEST, *Canad. med. Ass. J.* 90, 194 (1964). — 9. WARZYNSKI, R., Y. DEMIRJIAN und S. HOEBLER, *Canad. med. Ass. J.* 90, 225 (1964). — 10. DE VITO, E. und J. C. FASCILOLO, *Acta physiol. lat.-amer.* 15, 129 (1965). — 11. PICKENS, P. T., F. M. BUMPUS, A. M. LLOYDS, R. R. SMEBY und I. H. PAGE, *Circulat. Res.* 17, 438 (1965). — 12. AIDA, M., M. MAEBASHI, K. YOSHINAGA und F. ICHINOHE, *Tohoku J. exper. Med.* 87, 35 (1965). — 13. LUBASH, G. D., E. C. HAMMEL und R. J. MEARLES, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 18, 439 (1967). — 14. IMAI, M. und H. SOKABE, *Jap. Heart J.* 8, 607 (1967). — 15. KLAUS, D. und A. HEIZMANN, *diese Z.* 6, 1 (1968). — 16. SCHAFENBURG, C. A., E. HAAS und H. GOLDBLATT, *Amer. J. Physiol.* 199, 788 (1960). — 17. FRANZE DE FERNÁNDEZ, M. T., A. C. PALADINI und A. E. DELIUS, *Biochem. J.* 97, 540 (1965). — 18. KHAIRALLAH, P. A., F. M. BUMPUS, I. H. PAGE und R. R. SMEBY, *Science Washington* 140, 672 (1963). — 19. BRAUN-MENÉNDEZ, E., J. C. FASCILOLO, L. F. LÉLOIR, J. M. MUNOZ und A. C. TAQUINI, *Renal Hypertension*; Charles C. Thomas, Ed., Springfield/Ill. (1946). — 20. LEVER, A. F., J. I. S. ROBERTSON und M. TREE, *Biochem. J.* 91, 346 (1964). — 21. BING, J., *Acta path. microbiol. Scand.* 60, 311 (1964). — 22. CARRETERO, O. und F. GROSS, *Amer. J. Physiol.* 213, 695 (1967). — 23. CAPELLI, J. P., L. G. WESSON, Jr., G. E. APONTE, C. FARALDO und E. JAFFÉ, *J. Clin. Endocr., Springfield* 28, 221 (1968). — 24. VERNIORY, A., J. J. CUYKENS, B. LOTTEAU und CH. TOUSSAINT, *J. Urol. Néphrol.* 73, 276 (1967). — 25. SEALEY, J. E., J. N. GERTEN, J. G. G. LEDINGHAM und J. H. LARAGH, *J. clin. Endocr., Springfield* 27, 699 (1967).

Prof. Dr. H. Breuer
5300 Bonn-Venusberg
Inst. f. klin. Biochemie